รหัสโครงการ SUT1-104-41-24-01

รายงานการวิจัย

การเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม

(Bioconversion of Cassava Starch to Nutrient Sources for *Rhizobium*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

2. ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2541

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2545

บทคัดย่อ

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ร่วมกับรากของพืชตระกูลถั่วและช่วยตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ซึ่งเป็นประโยชน์มากด้านธาตุอาหารไนโตรเจนกับพืชอาศัย ปัจจุบันมีการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการปลูกพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ต้องการกลีเซอรอลหรือแมนนิทอลเป็นแหล่งอาหารหลัก และไม่สามารถใช้ทั้งกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียโดยทั่วไปนำไปใช้ได้ง่าย และซูโครส ในอาหารเลี้ยงไรโซเบียมส่วนใหญ่มีแมนนิทอลเป็นส่วนประกอบ ซึ่งทั้งกลีเซอรอลและแมนนิทอลมีมูลค่าสูงกว่ากลูโคสประมาณ 12-20 เท่า ทำให้มีต้นทุนสูงในการผลิตหัวเชื้อ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแหล่งอาหารที่มีกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบมูลค่าต่ำโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ เพื่อนำไปเลี้ยงไรโซเบียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้า ซึ่งอาจช่วยลดต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อได้ จากการคัดเลือกยีสต์จำนวน 147 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ และ 19 สายพันธุ์ จากแหล่งเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ด้านความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจากกลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง สามารถเลือกยีสต์ไอโซเลท KAY1 ซึ่งแยกจากผลกระเจี๊ยบสดได้ ยีสต์ไอโซเลทนี้สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีและผลิตแมนนิทอลสะสมภายในเซลล์ในปริมาณสูงสุดคือ 1.23-1.48 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงยีสต์นั้นในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมตามผลการศึกษาที่ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ (ปริมาตรอาหารที่ใช้ในการผลิตสูงสุดเท่ากับ 500 มิลลิลิตร) คือ อาหารที่มีเพียงส่วนประกอบของ แป้งมันสำปะหลังในปริมาณ 2.0 เปอร์เซ็นต์ Yeast extract 0.3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียม-ซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ โมโนโปรแทสเซียมฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 โดยใช้เชื้อเริ่มต้น (10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน การให้ความร้อนต่อเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารแป้ง ช่วยส่งเสริมความสามารถในการผลิตแมนนิทอล ให้ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นอีก 10.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดเพียง 3 วัน เมื่อนำไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้า คือ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 11O และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5 มาเลี้ยงในอาหารที่มีแมนนิทอลซึ่งเตรียมได้จากเซลล์ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 พบว่าไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดี มีจำนวนเซลล์สูงถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (โดยเฉลี่ย) ซึ่งได้ผลทำนองเดียวกับการเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารที่เตรียมโดยใช้แมนนิทอลที่ผลิตเป็นการค้า และจากการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดของยีสต์ พบว่ายีสต์ไอโซเลท KAY1 จัดอยู่ในสกุล *Rhodotorula* นอกจากนี้ยังได้ข้อมูลและเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของยีสต์อีกหลายสายพันธุ์ (ไอโซเลท) ที่มีความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลทั้งจากกลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง จากการคัดเลือกเชื้อในเบื้องต้น เพื่อการศึกษาต่อไป

Abstract

Rhizobia are effective nitrogen-fixing bacteria in symbiosis with legumes. Rhizobial inoculants are currently produced for growing several economic legumes. The utilization of carbon compounds by rhizobia varied with their species and strains. Most slow-growing rhizobia cannot use the simple sugar, glucose, as well as sucrose. Glycerol and mannitol, particularly mannitol, are mainly used for the cultivation of these slow-growing rhizobia. Prices of these carbohydrate compounds are about 12-20 times more expensive than glucose. Consequently, the production of these legume inoculants is costly. This study aims to produce nutrient sources containing glycerol and/or mannitol by the microbial conversion of cassava starch, a cheap raw material, for *Rhizobium* cultivation. The rhizobial inoculant production cost might be reduced. A total of 147 yeast isolates from natural habitat and 19 yeast strains from culture collections were screened for their glycerol and mannitol production capabilities using both glucose and cassava starch as carbon sources. The yeast isolate KAY1 isolated from rozelle fruit was selected. It could efficiently utilize cassava starch and accumulate mannitol in its cell. The maximum yield of mannitol was 1.23-1.48 grams per litre of cultured medium in the laboratory scale (500-mililitre working volume) when the yeast was cultivated in its suitable medium (at the initial pH of 6.0) on the rotary shaker (200 rpm) at 30°C for 4 days. And two percents of inoculum size containing approximate 10^6 cells per millilitre were applied. The suitable production medium composed of 2.0, 0.3, 0.5, 0.05, and 0.1% of cassava starch, yeast extract, ammonium sulphate, magnesium sulphate, and monopotassium phosphate respectively. When KAY1 cells were heated at 45°C for 20 minutes prior to inoculating into the starch production medium, the mannitol accumulation in yeast cells increased 10.5% higher than untreated cells within 3 days of cultivation. When cultured two slow-growing rhizobium strains, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 and *Bradyrhizobium* sp. THA 5, in the medium containing mannitol prepared from crude KAY1 cell lysate, both *Bradyrhizobium* strains gave their good growth of about 10^8 cells per mililitre. The similar result was achieved when the same composition of rhizobial medium was prepared using commercial grade mannitol. Yeast isolate KAY1 was identified as belonging to the genus *Rhodotorula.* Several yeast strains (isolates) basically tested and selected according to their starch utilization and glycerol and/or mannitol production are also kept for further investigation.